

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **08304373 A**

(43) Date of publication of application: **22.11.96**

(51) Int. Cl.

**G01N 30/84**  
**G01N 30/74**

(21) Application number: **07129732**

(22) Date of filing: **27.04.95**

(71) Applicant: **SHIMADZU CORP**

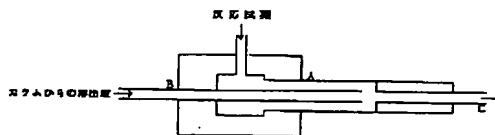
(72) Inventor: **YOKOMIZO YOSHIO**  
**NOKIHARA SEISHI**

**(54) POST COLUMN MIXER FOR CAPILLARY LC**

**(57) Abstract:**

**PURPOSE:** To easily provide a chromatogram of capillary liquid chromatography also for a material having no UV absorption by using a post column mixer for capillary LC.

**CONSTITUTION:** This post column mixer for capillary LC is formed of a tube A for carrying a reaction reagent and a tube B for carrying the effluent from a capillary liquid chromatograph (capillary LC). One end of the tube A is connected to a reaction reagent injection port, and the other end to the reaction coil of a detector. One end of the tube B is connected to a capillary column, and the other end is inserted into the tube A. The opening part of the inserted tube B is opposed to the connecting part between the tube A and the reaction coil with a space.



COPYRIGHT: (C)1996,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-304373

(43) 公開日 平成 8 年 (1996) 11 月 22 日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 30/84			G 0 1 N 30/84	A
30/74			30/74	A

審査請求 未請求 請求項の数 1 F D (全 4 頁)

(21) 出願番号 特願平7-129732

(22) 出願日 平成 7 年 (1995) 4 月 27 日

(71) 出願人 000001993

株式会社島津製作所

京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地

(72) 発明者 横溝 義男

京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地 株式会

社島津製作所中央研究所内

(72) 発明者 軒原 清史

京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地 株式会

社島津製作所中央研究所内

(74) 代理人 弁理士 細田 芳徳

(54) 【発明の名称】 キャピラリー LC 用ポストカラムミキサー

(57) 【要約】

【構成】 反応試薬を流すチューブ A とキャピラリー液体クロマトグラフィー (キャピラリー LC) からの溶出液が流れるチューブ B とから構成され、チューブ A の一端は反応試薬注入口に、他端は検出器の反応コイルにそれぞれ連結されており、チューブ B の一端はキャピラリーカラムに連結され、他端はチューブ A の中に挿入されており、挿入されたチューブ B の開口部がチューブ A と該反応コイルの連結部に対して間隙をもって対置しているキャピラリー LC 用ポストカラムミキサー。

【効果】 本発明のキャピラリー LC 用ポストカラムミキサーを用いることにより、UV 吸収をもたない物質についてもキャピラリー液体クロマトグラフィーのクロマトグラムを容易に得ることができる。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 反応試薬を流すチューブAとキャピラリー液体クロマトグラフィー（キャピラリーLC）からの溶出液が流れるチューブBとから構成され、チューブAの一端は反応試薬注入口に、他端は検出器の反応コイルにそれぞれ連結されており、チューブBの一端はキャピラリーカラムに連結され、他端はチューブAの中に挿入されており、挿入されたチューブBの開口部がチューブAと該反応コイルの連結部に対して間隙をもって対置しているキャピラリーLC用ポストカラムミキサー。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、キャピラリーLC用ポストカラムミキサーに関する。さらに詳しくは、UV吸収をもたない物質の微量検出に好適なキャピラリーLC用ポストカラムミキサーに関する。

## 【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】 最近、超微量の生体試料、特にタンパク質、ペプチドの検定および分取を目的としてキャピラリーLCが急激にクローズアップされてきた。このキャピラリーLCの特徴は、移動相中の溶質濃度が高いため、高感度であり、また微量流速であるため（実際には数 $\mu$ l/分）、質量分析計に直接導入も可能である。また、ピークを分取した場合、分画容量が数 $\mu$ lのため、目的とする微量物質が濃縮され、濃縮や凍結乾燥等の後処理をせずそのままプロテインシーケンサー等へ供試することができる。キャピラリーLCはこれら有利な点が多いが、UV検出器に限ると、例えば糖やアミノ酸、アミンなど比較的UV吸収の少ない物質の高感度検出には難点がある。従来、これらの試料に対しては、予め標識するか、カラムで分離した後試薬を加えて反応させ選択的に検出するポストカラム法が採用されてきた。しかし、キャピラリーカラムで分離後、誘導体化するポストカラム検出法を行う場合、既に述べたように、流速が数 $\mu$ l/分と小さいため、反応試薬との混合に用いられる従来のT型コネクタをそのまま用いると内部容量が数 $\mu$ lあるため、その部分でピーク拡散が生じ、有効なクロマトグラムが得られないという問題があった。

【0003】 従って、本発明の目的は、キャピラリーLCにより得られる溶出液のピーク拡散を生じさせずに反応試薬をこれに混合してUV吸収をもたない物質の正確な検出を可能とするキャピラリーLC用ポストカラムミキサーを提供することにある。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、上記の状況に鑑み、キャピラリーカラムで分離後の溶出液をピーク拡散が生じないように反応試薬と混合させるべく種々検討を重ねた結果、ピーク拡散をほとんど起こさずに溶出液と反応試薬とを効果的に混合することができるキ

2

ャピラリーLC用ポストカラムミキサーを開発することに成功した。

【0005】 即ち、本発明の要旨は反応試薬を流すチューブAとキャピラリー液体クロマトグラフィー（キャピラリーLC）からの溶出液が流れるチューブBとから構成され、チューブAの一端は反応試薬注入口に、他端は検出器の反応コイルにそれぞれ連結されており、チューブBの一端はキャピラリーカラムに連結され、他端はチューブAの中に挿入されており、挿入されたチューブBの開口部がチューブAと該反応コイルの連結部に対して僅かな間隙をもって対置しているキャピラリーLC用ポストカラムミキサーである。該連結部におけるチューブAの外径は、例えば $1/16'' \pm 0.05\text{mm}$ 、内径は $1.2\text{mm} \pm 0.05\text{mm}$ 、その中に挿入されるチューブBの外径は $1/32'' \pm 0.05\text{mm}$ 、内径は $0.05\text{mm} \pm 0.01\text{mm}$ であり、チューブCの内径は $0.075 \sim 0.2\text{mm} \pm 0.05\text{mm}$ であり、かつBとCの間隙が $1.0\text{mm} \pm 0.5\text{mm}$ であるキャピラリーLC用ポストカラムミキサー、に関する。

【0006】 以下に本発明について詳細に説明する。本発明のキャピラリーLC用ポストカラムミキサーの概要は、図1に示すとおりである。この図を用いて以下に説明する。本発明のミキサーは、反応試薬を流すチューブAとキャピラリー液体クロマトグラフィー（キャピラリーLC）からの溶出液が流れるチューブBとから構成される。これらのチューブの材質は正確な加工が可能であれば特に制限されるものではないが、通常はSUSが好ましい。本発明のミキサーにおいては、チューブAの一端は反応試薬注入口に、他端は検出器の反応コイルにそれぞれ連結されている。チューブBの一端はキャピラリーカラムに連結され、他端はチューブAに挿入されており、チューブAに挿入されたチューブBの開口部はチューブAと検出器の反応コイルの連結部に僅かな間隙を保って対置している構造を有している。

【0007】 チューブBを通して流れてくる溶出液は、チューブBと反応コイル連結部との間隙においてチューブAを流れる反応試薬と混合された後反応コイルに導入される。この間隙の容量が溶出液量に比して無視できない程大きいときはピーク拡散が生ずることになる。本発明においては、ピーク拡散を最小限に抑えるため、通常の混合と異なり溶出液の流れを反応試薬の流れが包囲する形で両液を接触させる。チューブBを流れる溶出液はストレートに反応コイルのチューブに移行するが、反応試薬は溶出液の周囲から溶出液に溶け込む形で割り込んでいくことになる。従って、混合の効率は良いとはいえないが、溶出液の流れは攪乱されず、ピーク拡散は最小限に抑えられる。溶出液に溶け込んだ反応試薬は反応コイル中で拡散し、溶出液中の溶質と反応して発色する。反応試薬の濃度が濃いときは、間隙における接触が短時間であっても効果的に発色する。

【0008】 本発明においては、上記の条件を満足する

3

ように、チューブAおよびチューブBのサイズ、並びにチューブBの開口部と反応コイル連結部との間隙が以下のように決められる。反応コイル連結部におけるチューブAは、外径 $1/16'' \pm 0.05\text{mm}$ であり、内径は $1.2\text{mm} \pm 0.05\text{mm}$ である。その中に挿入されるチューブBは外径 $1/32'' \pm 0.05\text{mm}$ であり、内径は $0.05\text{mm} \pm 0.01\text{mm}$ である。チューブCの内径は $0.075 \sim 0.2\text{mm} \pm 0.05\text{mm}$ である。また、チューブBの開口部とチューブCの反応コイル連結部までの間隙は $1.0\text{mm} \pm 0.5\text{mm}$ である

#### 【0009】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

#### 【0010】実施例1

(1) 本発明のキャピラリーLC用ポストカラムミキサーを用いた場合のピーク拡散の程度の検討

まず、UV吸収性物質であるウラシル、メチルベンゾエート、プロゲステロンおよびブチルベンゾエートの混合液を試料として、キャピラリーLC（島津SynProPepMicro C18 (LC Packings FUS-15-03-C18)  $4\mu\text{m}$   $0.3\text{i.d.} \times 150\text{mm}$ ）上で60%アセトニトリルによって分離したものを本発明のキャピラリーLC用ポストカラムミキサーを経由せずにUV検出器で検出した。得られたクロマトグラムを図2の(A)に示す。同一の試料を本発明のキャピラリーLC用ポストカラムミキサーを通し、図1のAに60%アセトニトリルを送液して得られたクロマトグラムを図2の(B)に示す。図2の(A)と(B)とを比較すると、ピーク形状に大きな差はなく、本発明のキャピラリーLC用ポストカラムミキサーは、ピーク拡散の防止に有効であることが分かった。

#### 【0011】実施例2

本発明のキャピラリーLC用ポストカラムミキサーを用いた場合の反応試薬と溶出液の混合効果の検討  
次に、UV吸収をもたないマルトース、マルトテトラオ

4

ース、マルトヘキサオースの混合液を試料とし、キャピラリーLC（島津SynProPepMicro C18  $4\mu\text{m}$   $0.3\text{i.d.} \times 150\text{mm}$ ）又はLC Packings FUS-15-03-C18  $3\mu\text{m}$   $0.3\text{i.d.} \times 150\text{mm}$ ）上で水を移動相として分離した溶出液を本発明のキャピラリーLC用ポストカラムミキサーによりフェニルヒドラジン試薬で発色させ（浜野ら、第37回 液体クロマトグラフ研究会 講演要旨38頁、1994年）、390nmのUV吸収で検出した。その結果を図3に示す。図3から明らかなように、それぞれの溶質のピークが得られたことから、反応試薬と溶出液との混合は有効であると判定された。従って、本発明のキャピラリーLCのためのポストカラムミキサーは、UV吸収をもたない物質のキャピラリーLCのクロマトグラムを得る場合に極めて有用である。

#### 【0012】

【発明の効果】本発明のキャピラリーLC用ポストカラムミキサーを用いることにより、UV吸収をもたない物質についてもキャピラリー液体クロマトグラフィーのクロマトグラムを容易に得ることができる。

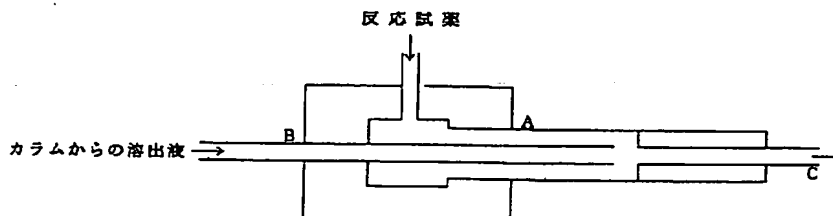
#### 20 【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、本発明のキャピラリーLC用ポストカラムミキサーの概念図である。

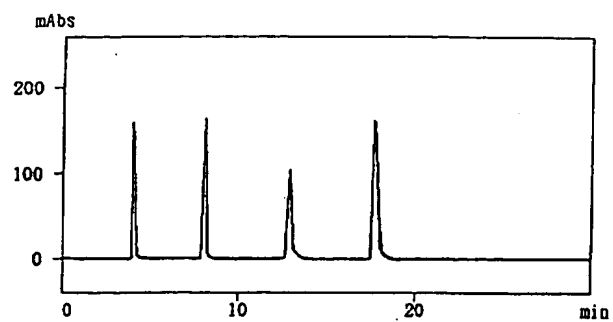
【図2】図2の(A)は、ウラシル、メチルベンゾエート、プロゲステロンおよびブチルベンゾエートの混合液についての、キャピラリーLCのクロマトグラムである。図2の(B)は、UV検出器の前に本発明のキャピラリーLC用ポストカラムミキサーを挿入したことを除き図2の(A)と同様にして得られたクロマトグラムである。

30 【図3】図3は、マルトース、マルトテトラオース、マルトヘキサオースの混合液を試料とし、キャピラリーLC上で分離したのち、本発明のキャピラリーLCのためのポストカラムミキサーを用い発色法で検出して得たクロマトグラムである。

【図1】

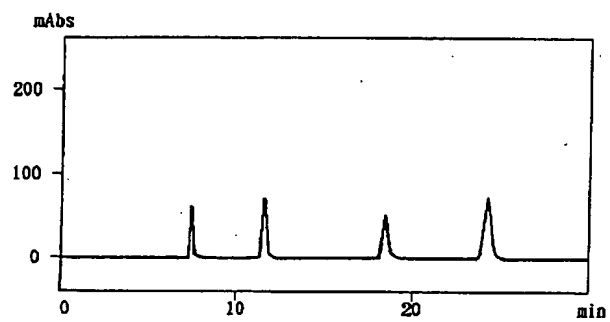
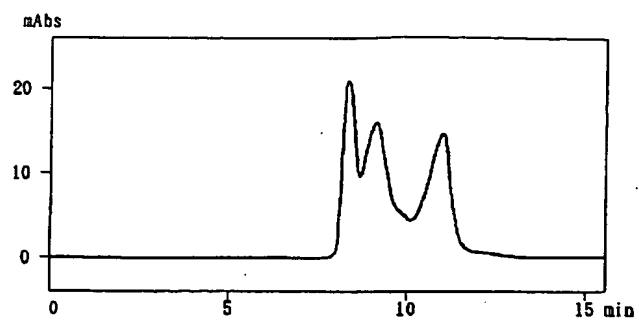


【図2】



(A) リアクター前

【図3】



(B) リアクター通過後